



Home



Search



List



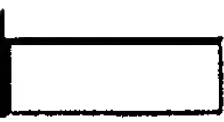
First



Prev



Go to



Next



Last

☐ Include

MicroPatent® PatSearch FullText: Record 21 of 22

Search scope: US EP WO JP; Claims, Title or Abstract

Years: 1976-2001

Text: nitrilase AND use NOT bromoxynil

[no drawing available]

[Download This Patent](#)[Family Lookup](#)[Citation Indicators](#)

[Go to first matching text](#)

EP0596812

Recombinant nitrilase and use (^) thereof

RHONE-POULENC CHIMIE

Inventor(s): Petre, Dominique ; Cerbelaud, Edith ; Levy-Schil, Sophie ; Crouzet, Joel

Application No. EP93420334 A1 EP, **Filed** 19930806, **A1 Published** 19940511

Abstract: The subject of the present invention is polypeptides having a nitrilase (^) activity, as well as the genetic tools for producing them, namely: - the DNA sequence encoding a polypeptide having a nitrilase (^) activity capable of hydrolysing nitriles to carboxylates, - an analogue of this sequence resulting from the degeneracy of the genetic code, - a DNA sequence hybridising with one of these sequences or a fragment thereof and encoding a polypeptide having a nitrilase (^) activity, - expression cassettes and microorganisms permitting their production. Application: enzymatic conversion of nitriles to carboxylates.

Int'l Class: C12N01555; C12N00978 C12N00121 C07K00308 C12P00740 C12P00744 C12N00121 C12R00119

Priority: FR 9209882 19920810

Designated States: BE DE ES FR GB IT NL

[Go to Claims](#)

Detailed Description

La présente invention a pour objet de nouveaux polypeptides présentant une activité nitrilase, les outils de génie génétique pour les produire, à savoir une séquence d'ADN, les cassettes d'expression portant cette séquence d'ADN recombinant et les micro-organismes recombinés (micro-organismes hôtes) contenant ladite séquence d'ADN.

La présente invention a également pour objet un procédé de transformation enzymatique des nitriles en carboxylates au moyen des polypeptides selon l'invention ou d'un micro-organisme hôte contenant la séquence d'ADN selon l'invention. Une application particulière du procédé de l'invention est la synthèse enzymatique de l'adipate d'ammonium ou du cyano-5 valérate d'ammonium par hydrolyse de l'adiponitrile à l'aide d'un polypeptide ou d'un micro-organisme hôte selon l'invention.

On sait que l'adipate d'ammonium est un produit particulièrement intéressant car il peut être transformé en acide adipique, un produit lui-même largement utilisé pour la préparation du Nylon-6,6.

L'hydrolyse enzymatique des dinitriles a été décrite par de nombreux auteurs. Cependant, les voies d'hydrolyse de ces dinitriles en acides organiques ne sont pas souvent évoquées. Le schéma théorique d'hydrolyse est le suivant :

NH =
nitrile hydratase
Ni =
nitrilase
A =
amidase
R =
(CH₂)_n, n étant un nombre entier égal à 4 dans le cas de l'adiponitrile.

En fait, on note très souvent que certaines voies sont privilégiées et que certains produits ne se forment pas ou bien ne sont pas hydrolysés.

Parmi les micro-organismes chez lesquels on a pu démontrer l'existence d'une activité enzymatique permettant cette hydrolyse, on peut citer notamment les souches appartenant au genre *Fusarium*, qui dégradent le succinonitrile et l'adiponitrile sans indication sur les produits de la réaction [Goldlust et al., *Biotechnol. and Appl. Biochem.*, 1989, 11, 581] ; les souches appartenant au genre *Pseudomonas*, qui dégradent l'adiponitrile [Yanase et al., *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46, 2925] ; et les souches appartenant au genre *Rhodococcus*, en particulier *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11 216, qui hydrolyse l'adiponitrile en acide adipique [Bengis-Garber et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, 32, II] et aussi *Rhodococcus rhodochrous* K22 dont la nitrilase permet l'hydrolyse de l'adiponitrile et du glutaronitrile [Yamada et al., *J. Bacteriol.*, 1990, 172 (9), 4807-4815], cependant avec un rapport d'activité faible comparativement à celui de l'hydrolyse des nitriles aromatiques.

Par conséquent, on voit que l'hydrolyse enzymatique des dinitriles est assez complexe: dans tous les cas, la première fonction CN est bien hydrolysée par l'enzyme, alors que la deuxième fonction ne l'est pas du tout dans certains cas ou bien avec une vitesse très faible dans d'autres.

On a maintenant trouvé qu'il était possible d'hydrolyser totalement et rapidement les nitriles en carboxylates et plus particulièrement les dinitriles en carboxylates ou dicarboxylates en faisant appel à des enzymes convenablement sélectionnées, utilisées soit telles quelles, soit, de préférence, sous la forme de micro-organismes recombinés les générant.

La présente invention a donc pour objet de nouveaux polypeptides ayant une activité nitrilase, qui ont été isolés à partir d'une souche de *Comamonas testosteroni*. Plus précisément, ces polypeptides sont préparés par extraction et

purification à partir de cultures de micro-organismes naturels ou recombinants, la purification étant réalisée par une succession d'étapes consistant à préparer un extrait enzymatique à partir de la culture cellulaire, à précipiter cet extrait avec du sulfate d'ammonium et à le purifier par différentes étapes de chromatographie et filtration sur gel. Ces étapes, qui font appel à des techniques bien connues de

l'homme du métier, sont décrites en détail dans les exemples illustratifs ci-après.

Par "activité nitrilase", on désigne dans la présente description la conversion directe d'un nitrile en carboxylate d'ammonium, l'amide correspondant n'étant pas un substrat de l'enzyme.

Un autre objet de l'invention concerne une séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase. La séquence d'ADN codant pour un polypeptide de l'invention peut être choisie parmi :

- la séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase, telle que représentée à la **fig. 4**,
- un analogue de cette séquence résultant de la dégénérescence du code génétique,
- ou bien une séquence d'ADN hybridant avec l'une de ces séquences ou avec un fragment de celles-ci et codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase.

Une telle séquence d'ADN peut être obtenue par clonage du fragment d'AdN génomique codant pour le polypeptide recherché, à l'aide de sondes nucléotidiques élaborées à partir du polypeptide purifié.

L'invention concerne également les cassettes d'expression qui portent, avec les signaux assurant son expression, la séquence d'ADN recombinant définie précédemment. Ces cassettes d'expression peuvent être soit intégrées dans le génome de l'hôte, soit localisées sur un vecteur d'expression, tel qu'un plasmide contenant un moyen de sélection.

Ces cassettes d'expression comportent notamment des régions d'initiation de la transcription et de la traduction, qui contiennent un site de fixation des ribosomes et une séquence promotrice. Ces régions peuvent être homologues ou hétérologues du micro-organisme produisant naturellement le polypeptide.

Le choix de ces régions dépend notamment de l'hôte utilisé. En particulier, lorsqu'il s'agit de micro-organismes hôtes procaryotes, le promoteur

hétérologue peut être choisi parmi les promoteurs bactériens forts, tels que le promoteur de l'opéron tryptophane P_{trp} de *E. coli*, le promoteur de l'opéron lactose P_{lac} de *E. coli*, le promoteur droit du phage lambda P_R , le promoteur gauche du phage lambda P_L , les promoteurs forts de *Pseudomonas* et *Comamonas*, les promoteurs forts de *Corynebactéries*.

Plus particulièrement, dans le cas du promoteur droit du phage lambda, la forme thermosensible P_{RCIts} pourra être préférée. Dans le cas des micro-organismes eucaryotes, tels les levures, les promoteurs peuvent être issus de gènes glycolytiques de levure, tels les gènes codant pour la phosphoglycérate kinase (PGK), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), la lactase (LAC4), l'énolase (ENO).

Concernant les sites de fixation des ribosomes, celui dérivé du gène CII de lambda ainsi que ceux dérivés de gènes homologues de *Comamonas* ou *Pseudomonas* ou ceux dérivés de gènes de *Corynebacteries* sont utilisés préférentiellement lorsque le micro-organisme hôte est procaryote.

Une région permettant une terminaison de la traduction et de la transcription fonctionnelle de l'hôte envisagé peut être positionnée en 3' de la séquence codante. La cassette d'expression comprend également un ou plusieurs marqueurs permettant de sélectionner l'hôte recombinant. Les marqueurs préférés sont des marqueurs dominants, c'est-à-dire conférant une résistance à des antibiotiques comme l'ampicilline ou la streptomycine ou à d'autres produits toxiques.

Parmi les micro-organismes hôtes utilisés, on peut citer notamment les entérobactéries telles que *E. coli*, les bactéries appartenant aux genres *Comamonas* ou *Pseudomonas*, les bactéries corynéformes telles que

celles appartenant aux genres *Corynebacterium*, *Brevibacterium* ou *Rhodococcus*.

L'invention a également pour objet les micro- organismes contenant la séquence d'ADN recombinante selon l'invention, par exemple sur un plasmide comportant un moyen de sélection.

Un micro-organisme recombiné contenant ladite séquence d'ADN sur une structure plasmidique a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.) (Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris) sous le

n°I-1242 le 21 juillet 1992. Ce micro-organisme est la souche *E. coli* TG1 qui contient le plasmide pXL2148 ; ce micro- organisme est également identifié par la Demanderesse par la référence G4207.

L'invention a également pour objet les micro-organismes susceptibles de transformer des nitriles en carboxylates et plus particulièrement des dinitriles aliphatiques de formule NC - R - CN dans laquelle R est un groupe alkylène linéaire ou ramifié ayant de 1 à 10 atomes de carbone en carboxylates.

Au-delà de l'acquisition de leurs structures I et II lors de leur synthèse par les micro-organismes selon l'invention, il est important que les polypeptides considérés se stabilisent dans leurs structures III et IV, de façon à être doués d'une activité nitrilase optimale.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir découvert des moyens pour favoriser la susdite stabilisation.

Ainsi, tout micro-organisme selon l'invention contient, de préférence :

- au moins un agent protéique d'aide au repliement des polypeptides qu'il synthétise et, en particulier, de la nitrilase dont il est question dans le présent exposé,
- et/ou les gènes codant pour un tel agent, cet agent étant présent dans une quantité supérieure à celle correspondant au niveau de base du micro-organisme considéré.

Par niveau de base, on entend, au sens de la présente invention, le niveau maximum pouvant être atteint par le micro-organisme sauvage correspondant considéré.

Avantageusement, cet agent est la chaperone GroE de *E. coli* ou son homologue d'origine eucaryote ou procaryote.

La chaperone GroE d'*E. coli* est normalement présente dans les souches sauvages.

Les gènes codant pour l'agent sont portés par le chromosome ou par un élément extra-chromosique (plasmide, phage). Il est préférable de les amplifier par tout moyen connu et approprié, de manière à favoriser la synthèse d'agent dans le micro-organisme.

Les gènes codant pour l'agent sont sous la dépendance de systèmes d'expression homologues ou hétérologues de leur micro- organisme hôte.

L'invention concerne aussi le procédé de transformation des nitriles en carboxylates à l'aide d'un polypeptide selon l'invention ou d'un micro-organisme recombiné le générant. Ce procédé consiste à mettre en présence le nitrile à transformer avec un polypeptide ou un micro-organisme recombiné tel que défini précédemment. On opère généralement à la température ambiante. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le polypeptide ou le micro- organisme recombiné est immobilisé sur ou dans un support solide.

Le procédé de l'invention convient pour la transformation des nitriles en carboxylates et plus particulièrement pour la transformation en carboxylates des dinitriles de formule NC - R - CN dans

laquelle R est un groupe alkylène linéaire ou ramifié contenant 1 à 10 atomes de carbone.

Le procédé de l'invention est particulièrement approprié pour la synthèse enzymatique de l'adipate d'ammonium à partir d'adiponitrile.

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer les caractéristiques et les avantages de la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

DESCRIPTION DES FIGURES

La **fig. 1** représente le rendement (%) d'hydrolyse de l'adiponitrile en cyanovalérate (courbe a) et en adipate d'ammonium (courbe b) en fonction du temps de réaction en heures pour la souche *Comamonas testosteroni* sp.

Les **fig. 2a** et **2b** représentent les cartes de restriction des plasmides pXL2075 et pXL2076.

La **fig. 3** représente la carte de restriction du fragment SstI- SstI de 4,1 kb contenant la séquence d'ADN (dénommée sur la figure "gène de la nitrilase") codant pour le polypeptide ayant l'activité nitrilase selon l'invention, fragment présent dans les plasmides pXL2075 et pXL2076. La stratégie d'élaboration du fragment XbaI-SstI contenant la séquence d'ADN selon l'invention est également représentée sur cette figure.

La **fig. 4** représente la séquence d'ADN selon l'invention avec sa séquence d'acides aminés déduite.

La **fig. 5** représente la carte de restriction du plasmide pXL2087.

La **fig. 6** représente la carte de restriction du plasmide pXL2148.

La **fig. 7** représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE SDS à 10 % montrant l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention dans la souche *E. coli* TG1/pXL2027. Chaque piste correspond à une quantité de protéine équivalente à 60 µl de culture à une densité optique à 610 nm de 3.

La **fig. 8** représente la carte de restriction du plasmide pXL2158.

La **fig. 9** représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE SDS à 12,5 % montrant l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention dans les souches TG1/pXL2158 et TG1/pXL2158 + pXL2035 (GroE).

La **fig. 10** représente la carte de restriction du plasmide pXL 2169.

la **fig. 11** représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE SDS à 10 % montrant l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention dans la souche *Pseudomonas putida* G2081 - pXL2169.

Les abréviations utilisées dans la suite de la description ont les significations ci-après :

SSC :

tampon couramment utilisé pour des hybridations ; il contient du citrate de sodium et du NaCl.
(20XSSC = NaCl 3M-citrate de sodium pH 7, 0,3 M)

SDS :

dodécylsulfate de sodium

FPLC :

chromatographie liquide dénommée en langue anglaise "fast protein liquid chromatography"

SDS-PAGE :

électrophorèse en gel à base de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide

IPTG :

isopropyl β -D thiogalactopyranoside.

EXEMPLES

EXEMPLE 1: PURIFICATION DE LA NITRILASE DE *Comamonas testosteroni* sp.

1 - PRÉPARATION DES CELLULES :

Une souche de *Comamonas testosteroni* sp a été cultivée, en fiole agitée, à 28°C, pendant 15 h 30, dans le milieu A dont la composition est la suivante : Milieu A - Glucose 5 g/l - (NH₄)₂SO₄ 1 g/l - NaH₂PO₄ 5,24 g/l - KH₂PO₄ 2,77 g/l - Extrait de levure 5 g/l - Casamino Acides 1 g/l

Cette préculture a servi à ensemer un fermenteur de 20 l contenant 15 l de milieu A. Le pH, la température, le débit d'air et la vitesse d'agitation ont été réglés respectivement à 6, 6, 28°C, 300 l/h et 350 tr/min. Après 24 h, 84 g de cellules humides ont été récoltées. Cela correspond à une teneur en poids sec de cellules de 0,9 g/l et à une densité optique à 660 nm (DO_{660 nm}) de 2.

2 - DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE SUR ADIPONITRILE :

Un culot cellulaire contenant 13,1 mg de poids sec de cellules a été mis en suspension dans 2 ml d'une solution 52,3 mM en adiponitrile dans le tampon phosphate de potassium 50 mM ; pH 7. La réaction a été conduite à 25°C sous agitation et la cinétique a été suivie par prélèvement. Sur chaque prélèvement ont été dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) le cyano-5-valéramide, l'adipamide, le cyano-5-valérate, l'adipamate et l'adipate. Les résultats sont regroupés sur la **fig. 1** qui représente les courbes de rendement (en ordonnées) en cyanovalérate (courbe a) et en adipate d'ammonium (courbe b). La vitesse de formation du cyanovalérate et de l'adipate était respectivement supérieure à 0,45 et égale à 0,15 U/mg de cellules poids sec

(1 U est égale à 1 μ mole de produit formé par minute).

3- PURIFICATION :

Toutes les étapes de la purification ont été réalisées dans le tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM de dithioérythritol (DTE) sauf indication contraire. A chacune des étapes, l'activité nitrilase des fractions a été déterminée à pH 7 et à 25°C dans le tampon phosphate 10 mM en présence d'adiponitrile 10 mM. La concentration en protéine des pools a été déterminée par la méthode au bleu de Coomassie (kit PIERCE Protein assay). Les protéines ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (Phastsystem PHARMACIA). Les modes opératoires de chacune des étapes sont commentés ci-dessous.

Etape 1 : Extrait brut

57 g de cellules humides ont été reprises dans 85 ml de tampon et traitées aux ultrasons pendant 30 min (Sonicateur VIBRACELL de Bioblock : Sonde 13 mm ; puissance 7 ; 40 % du cycle actif). La DO_{nm} est passée ainsi de 97 à 60. Après centrifugation à 48 000 g maximum pendant 60 min, le surnageant a été récupéré.

Ce surnageant a été amené, par adjonction progressive de sulfate d'ammonium, à 15 % de la saturation. Après 1 h, la suspension a été centrifugée 30 min à 30 000 g maximum. Le surnageant a été amené à 50 % de la saturation. Après 1 h, la suspension a été centrifugée dans les mêmes conditions, le précipité a été récupéré puis dialysé contre le tampon pendant deux jours.

Etape 2 : Colonne échangeuse d'ions (Q Sepharose Fast Flow)

La fraction dialysée a été chargée à un débit de 125 ml/h sur une colonne (26 x 380 mm) de "Q Sepharose Fast Flow" équilibrée avec le tampon à un débit de 250 ml/h. La colonne a été percolée à un débit de 250 ml/h successivement par les solutions suivantes :

- 166 ml de tampon
- 180 ml d'un gradient 0 à 0,2 M en KCl dans le tampon
- 180 ml de tampon additionné de KCl 0,2 M
- 270 ml d'un gradient 0,2 à 0,4 M en KCl dans le tampon
- 180 ml de tampon additionné de KCl 0,4 M
- 200 ml de tampon additionné de KCl 1 M

La fraction ayant l'activité nitrilase a été éluée dans un volume de 129 ml au cours du palier à 0,2 M en KCl.

Les étapes suivantes sont réalisées sur le système FPLC (Pharmacia).

Etape 3 : filtration sur gel (FPLC Superdex 200)

La fraction ayant l'activité nitrilase obtenue précédemment (129 ml) a été concentrée jusqu'à 12 ml par précipitation des protéines avec du sulfate d'ammonium à 80 % de la saturation, suivie d'une dialyse contre le tampon. La fraction ainsi concentrée (12 ml) a été chargée en 2 fois sur la colonne de gel (16 x 600 mm) équilibrée avec le tampon additionné de 0,1 M de KCl à un débit de 0,8 ml/min. Les fractions ayant l'activité nitrilase ont été éluées avec le tampon ci-dessus à un débit de 1 ml/min et dans un volume total de 36 ml. Ces fractions correspondent à un poids moléculaire de 280 kDa.

Etape 4 : Colonne d'hydroxyapatite (BIO-RAD HPHT; 7,8 x 100 mm)

Les fractions obtenues ci-dessus ont été concentrées à 8 ml par ultrafiltration (membrane DIAFLO PM 39 AMICON). La solution concentrée a été injectée sur la colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec le

tampon additionné de CaCl_2 , 10 μM . La colonne a été percolée, à un débit de 0,5 ml/min, successivement avec :

- 5 ml du tampon d'équilibrage,
- 15 ml d'un gradient de phosphate de potassium de 0 à 350 mM dans le tampon d'équilibrage,
- 10 ml du tampon d'équilibrage additionné de 350 mM de phosphate de potassium.

Les fractions ayant l'activité nitrilase ont été éluées entre 62 et 135 mM en phosphate de potassium sur un volume de 3 ml.

Etape 5 : Colonne d'interaction hydrophobe (FPLC-Phenyl Superose HR 5/5)

Les fractions actives obtenues ci-dessus, amenées à 15 % de la saturation en sulfate d'ammonium, ont été chargées à un débit de 0,5 ml/min sur la colonne, équilibrée avec du tampon contenant du sulfate d'ammonium à 15 % de la saturation. La colonne a été percolée avec :

- 6 ml de tampon d'équilibrage,
- 12 ml d'un gradient décroissant de sulfate d'ammonium 15 % à 0 % de la saturation en sulfate d'ammonium dans le tampon,
- 23 ml de tampon.

Une partie des fractions ayant l'activité nitrilase ont été éluées lors du lavage de la colonne avec le tampon d'équilibrage. Ces fractions actives ont été réinjectées dans les mêmes conditions. Cette opération a été effectuée deux fois. Les fractions actives, éluées après le gradient, ont été réunies (volume 51 ml).

Etape 6 : Filtration sur gel (FPLC-Superdex 200)

Les 51 ml ont été concentrés à 3 ml par ultrafiltration sur membrane (AMICON DIAFLO PM30). Ces 3 ml ont été chargés sur la colonne (16 x 600 mm), équilibrée avec le tampon additionné de 0,1 M KCl. Les 9 ml contenant l'activité ont été élués à une position correspondant à un poids moléculaire de 280 kDa. Cette solution a été amenée à 36 % de glycérol puis congelée pendant 15 jours.

Etape 7 : Colonne échangeuse d'ions (FPLC Mono Q HR 5/5)

La solution protéique a été décongelée et chargée sur la colonne, équilibrée avec le tampon contenant 0,1 M de KCl, à un débit de 0,5 ml/min. La colonne a été percolée successivement avec :

- 15 ml à 0,5 ml/min de tampon additionné de 0,1 M en KCl,
- 4,5 ml à 1 ml/min de tampon additionné de 0,1 M en KCl,
- 15 ml à 1 ml/min d'un gradient de KCl de 0,1 à 0,4 M dans le tampon,
- 10 ml de tampon additionné de 0,4 M de KCl.

Les fractions actives ont été éluées entre 0,15 et 0,3 M de KCl. Ces fractions sont homogènes. Par analyse SDS-PAGE, deux bandes très proches de 38 et 39 kDa sont visibles. Les fractions ainsi obtenues seront dénommées ci-après "nitrilase purifiée".

Les données de chacune des étapes de purification ci-dessus sont rassemblées dans le tableau 1 ci-après :

ABRÉVIATIONS :

PF = coefficient de purification ; U = $\mu\text{mol/h}$

4 - DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE N-TERMINALE DE LA NITRILASE

A partir de la protéine purifiée, la séquence N- terminale de 27 aminoacides a été déterminée par dégradation séquentielle automatique d'Edman en utilisant un appareil "Applied Biosystems Model 470 A". Cette séquence est la suivante :

La recherche dans les banques de séquences a permis de trouver une identité de 53 % avec la nitrilase de *Klebsiella pneumoniae* active sur le Bromoxynile, qui fait l'objet de la demande de brevet EP N° 373 173.

5 - ACTIVITÉ DE LA NITRILASE PURIFIÉE :

- a) - Influence du pH sur l'activité de la nitrilase :

La nitrilase purifiée a été testée à différents pH sur deux substrats adiponitrile et cyano-5-valérate dans les conditions indiquées dans le tableau 2 ci- après.

CONDITIONS COMMUNES :

[substrat] = 10 mM ; tampon 10 mM ; T°C 25 ;
[nitrilase] 12 $\mu\text{g/ml}$ pour le cyanovalérate et

3 $\mu\text{g/ml}$ pour l'adiponitrile (fraction étape 6) ;

U (Adiponitrile) = μmole de cyanovalérate formé/h, U (cyanovalérate) = μmole d'adipate formé/h.

- b) - Spectre d'activité de la nitrilase purifiée :

Les activités de la nitrilase purifiée ont été mesurées sur adiponitrile, cyano-5-valéramide, acide cyano-5-valérique, benzonitrile, propionitrile, acrylonitrile. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

CONDITIONS COMMUNES :

tampon acétate : 10 mM pH 4 ; substrat 10 mM ; volume = 3 ml ; T = 25°C ; durée de la réaction = 1 ou 3 h ; protéines : de 5 à 30 $\mu\text{g/ml}$.

EXEMPLE 2 : CLONAGE DE LA NITRILASE DE *Comamonas testosteroni* sp.

A partir de la séquence NH₂ terminale présentée dans l'exemple 1, une sonde nucléotidique a été synthétisée ; le pourcentage en GC élevé des souches de *Comamonas* décrites dans la littérature (Tamaoka et al., Int. J. Syst. Bacteriol,

1987, 37, 52-59) a dicté un choix pour la troisième position du codon dans le cas des lysines et dans le cas de la valine. La sonde est un 26 mer 128 fois dégénéré (N remplace A, C, G ou T) :

La stratégie suivie a consisté tout d'abord à vérifier la spécificité de cette sonde nucléotidique et à déterminer la nature des fragments d'AdN génomique à cloner. Brièvement, l'AdN génomique de *Comamonas testosteroni* sp. a été digéré par plusieurs enzymes de restriction (SstI, SphI, BamHI, PstI...) correspondant à des sites utilisables pour le clonage.

Après électrophorèse sur gel d'agarose et transfert sur membrane de Nylon, les diverses digestions ont été hybridées à la sonde. On constate que la sonde a une spécificité suffisante dans les conditions d'hybridation utilisées (tampon d'hybridation = 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1 % SDS, 50 mM Na₂PO₄; pH 6,5, 250 µg/ml ssAdN ; température d'hybridation 50°C. Conditions de lavage : 1 h, 6x SSC, température ambiante et 5 min en 2x SSC, 0,1 % SDS à 50°C).

Dans ces conditions, la sonde a permis d'obtenir des signaux importants et sans ambiguïté ; en particulier, dans le cas des digestions par SstI, SphI, BamHI et PstI. Les empreintes d'hybridation montrent en particulier l'existence d'un fragment unique SstI-SstI d'environ 4 kb. Afin de cloner ce fragment, les fragments de 3, 5 à 4,5 kb d'une digestion SstI de l'AdN génomique ont été purifiés par électrophorèse préparative sur agarose et électroélution, puis ligaturés au plasmide pUC19 (YANISCH et al., Gene 33 (1985)103), lui-même digéré par SstI. Après transformation dans la souche DH5α (Clontech Laboratory, Palo Alto Californie), 600 clones blancs sur LB amp X- gal (SAMBROOK et al., Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. 1989) ont été repiqués individuellement, transférés sur membrane de Nylon, puis analysés par hybridation avec la sonde ayant servi pour hybrider le Southern blot et ce dans les mêmes conditions de stringence. Six clones ont ainsi été repérés comme hybridant

très fortement avec la sonde. Deux clones ayant inséré le même fragment d'environ 4,1 kb dans les deux orientations (pXL2075 [fig. 2a] et pXL2076 [fig. 2b]) ont été analysés plus en détail (cartographie de restriction, séquençage partiel en utilisant la sonde comme amorce et Southern blot). Il a ainsi pu être montré que la partie 5' du gène qui hybride avec la sonde est localisée sur un fragment de XhoI-XbaI de 150 pb environ orienté dans le sens XhoI vers XbaI. Les fig. 2a et 2b représentent les cartes de restriction de ces plasmides.

EXEMPLE 3 : SÉQUENCE D'UN FRAGMENT DE 1194 pb CONTENANT L'AdN CODANT POUR LE POLYPEPTIDE AYANT L'ACTIVITÉ NITRILASE.

La localisation sur l'insert cloné du fragment de 1194 pb contenant le gène de la nitrilase séquencé est indiquée sur la fig. 3. La stratégie de séquençage de ce fragment réalisé selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier est également indiquée sur la fig. 3. Les diverses séquences ont toutes été obtenues par la méthode de terminaison de chaînes (kit sequenase en présence de 7-deaza dGTP ; (³S)dATP soit sur des matrices simple brin de M13 (mp 18 ou 19, voir YANISCH et al., op. cité) recombinant portant des sous-fragments, soit directement sur le plasmide pXL2075). Plusieurs amorces spécifiques ont également été synthétisées dans ce but.

La séquence d'ADN selon l'invention est représentée sur la fig. 4. Le pourcentage en G+C moyen de la séquence obtenue est de 45,7 % ce qui est inférieur au pourcentage G+C de 61,5 % décrit chez d'autres souches de *Comamonas* (Tamaoka et al., op. cité). Une analyse de la séquence obtenue a permis de caractériser une phase ouverte de 1064 pb, appelée ci-après gène *nit*, codant pour un polypeptide de 354 résidus correspondant à un poids moléculaire de 38 725 Da. La séquence en acides aminés de ce polypeptide est indiquée sur la fig. 4. Ce polypeptide comprend la séquence NH₂ terminale

utilisée pour synthétiser la sonde ainsi que trois séquences internes déterminées sur des fragments tryptiques de la nitrilase purifiée (ces séquences internes sont

soulignées sur la **fig. 4**).

Ainsi, cette phase ouverte représente la séquence d'ADN selon l'invention.

EXEMPLE 4 : HOMOLOGIE AVEC D'AUTRES PROTÉINES, IDENTIFICATION DE SÉQUENCE HOMOLOGUE.

La séquence d'ADN selon l'invention a été comparée avec l'ensemble des séquences de la banque de protéines NBRF ; seule une homologie significative a été trouvée avec la Nitrilase de *Klebsiella ozaenae* spécifique de l'herbicide Bromoxynil (Stalker et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 6310-6314). Les deux nitrilases présentent une homologie stricte de 34,9 % répartie sur 320 acides aminés. Par ailleurs, cette protéine présente 34,4 % d'homologie stricte répartie sur 312 acides aminés avec la nitrilase d'*Arabidopsis* spécifique de l'indole-3-acétonitrile [Bartling & al., Eur. J. Biochem. 205, 417-424, 1992].

EXEMPLE 5 : EXPRESSION DE LA NITRILASE DANS *E. Coli*.

Afin de confirmer l'identification de la phase codante avec la nitrilase purifiée, le gène *nit*, précédé de son propre site de fixation des ribosomes, a été placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose de *E. coli* selon le mode opératoire décrit ci-après : le plasmide pXL2087, décrit sur la **fig. 5**, a été obtenu par insertion du fragment XhoI-NcoI dérivé du plasmide pXL2075 entre les sites correspondants du vecteur pMTL25 (Chambers et al., Gene, 1988, 68, 139-149). Ce plasmide contient donc le promoteur de l'opéron lactose Plac, suivi du site de fixation des ribosomes et du gène structural de la nitrilase, ainsi qu'un gène conférant la résistance à l'ampicilline.

L'expression de la nitrilase a été visualisée chez la souche *E. coli* TG1 contenant le plasmide pXL2087. Dans ce but, la souche TG1/pXL2087, ainsi que la souche témoin TG1/pUC19, ont été cultivées 16 h en milieu LB à 37°C (Miller, J.H. 1972, Experiments in Molecular Genetics - Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, puis diluées au 100ème

dans le même milieu et à la même température. Lorsque les cultures ont atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,5 et 1, de l'IPTG, à la concentration finale de 1 mM a été ajouté. Après 2 h de culture, les bactéries ont été collectées.

L'expression de la nitrilase a été mesurée, après sonication des cellules, en gel SDS-PAGE, dans la fraction brute ou après centrifugation dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la **fig. 7** et montrent un niveau élevé d'expression de la nitrilase dans les extraits de cellules cultivées en présence d'IPTG ; toutefois, cette protéine est essentiellement sous forme insoluble.

Sur la **fig. 7**, M représente le marqueur de poids moléculaires ; ceux-ci sont indiqués en kDa. D'autre part, les pistes ont les significations ci-après :

A partir du plasmide pXL2087, on a préparé le plasmide pXL2148 par insertion du fragment XhoI-EcoRI du plasmide pXL2087, portant le gène codant pour la nitrilase entre les sites Sall et EcoRI de

pBR322 [SUTCLIFFE, Nucleic Acid Res. 5, (1978): 2721-2730].

Ce plasmide pXL2148, dont la carte de restriction est représentée sur la **fig. 6**, a été également utilisé pour transformer la souche de *E. coli* TG1 selon la méthode du chlorure de calcium. La sélection des micro-organismes a été faite sur ampicilline. La souche *E. coli* TG1 (pXL2048) (G4207) ainsi transformée a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes à Paris (Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux) sous le n° I-1242 le 21 juillet 1992.

D'autres systèmes d'expression ont été utilisés pour produire la nitrilase dans un micro-organisme recombinant.

Tout d'abord, le gène *nit* a été exprimé dans *E. coli* derrière le promoteur de l'opéron tryptophane de *E. coli*, sous la dépendance du RBS du gène CII du phage λ . Pour ce faire, un site de restriction *NdeI* a été créé sur le codon d'initiation de *nit* et le fragment *NdeI/AhaII* de 117 pb contenant la partie 5' du gène *nit* a été amplifié par la technique de PCR, à partir de pXL2087. Un fragment *NdeI/XbaI* de 61 pb, obtenu après digestion du premier fragment, a été ligué au fragment *EcoRI/NdeI* contenant le promoteur de l'opéron tryptophane de *E. coli* et le site de fixation des ribosomes du gène CII du bactériophage λ (P_{trp}-RBSCII) entre les sites *EcoRI* et *XbaI* de pUC19 (Yanisch et al., Gene 33 (1985) 103) pour aboutir au plasmide pXL2149. Le fragment *EcoRI/XbaI* de pXL2149, contenant la partie 5' de *nit* derrière P_{trp}-RBSCII, a été ligué avec le fragment *XbaI/SalI* de pXL2087 contenant la partie 3' du gène *nit* entre les sites *EcoRI* et *SalI* de pXL642 (Mayaux, résultats non publiés) : pXL642 est un dérivé de pXL534 (Latta et al., 1990. DNA Cell Biol., 9, 129) dans lequel le gène surexprimé code pour un inhibiteur tissulaire de métallo-protéases et dans lequel le site *HindIII* en aval du gène surexprimé a été remplacé par le multisite *EcoRI/HindIII* de M13mp18.

Le plasmide pXL2158 final est donc un dérivé de pBR322 (Sutcliffe, Nucleic Acid Res. 5, (1978) : 2721) contenant un gène conférant la résistance à l'ampicilline et le gène *nit* sous contrôle de P_{trp}-RBSCII. La carte de restriction de ce plasmide pXL2158 est représentée à la **fig. 8**.

Le plasmide pXL2158 a été utilisé pour transformer la souche *E. coli* TG1. La souche TG1/pXL2158, ainsi que la souche témoin TG1 contenant le vecteur pMTL22, ont été cultivées 16 h en milieu M9 glucose à 30°C (Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 100 µg/ml de tryptophane. Ces cultures ont été diluées 100 fois dans le même milieu en absence de tryptophane et cultivées pendant 6 heures à la même température.

L'expression de la nitrilase de *Comamonas testosteroni* NI 1 a été mesurée, après sonication des cellules, en gel SDS-PAGE 12,5%, dans la fraction brute ou,

après centrifugation, dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la **fig. 9**.

On voit sur ce gel que pXL2158 induit une forte expression de la nitrilase majoritairement sous forme insoluble.

L'efficacité de la chaperone GroE a été alors testée (Hemmingsen et al., 1988. Nature. 333 : 330) pour aider au repliement correct de la nitrilase. Pour ce faire, le plasmide pXL2035 a été construit de la manière suivante. Le fragment *EcoRI/HindIII* de 2,2 kb contenant les gènes *groES* et *groEL*, codant pour les deux sous-unités de GroE, a été extrait du plasmide pOF39 (Fayet et al., 1986. Mol. Gen. Genet. 202: 435) et introduit entre les sites *EcoRI* et *HindIII* du vecteur pDSK519 (Keen et al., 1988. Gene. 70 : 191).

Le plasmide pXL2035 a été introduit dans la souche TG1 contenant pXL2158. La souche résultante a

été cultivée dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de kanamycine 50 mg/l ; les résultats d'expression sont visualisés sur la **fig. 9**. Il ressort que la surexpression de GroE (seule la sous-unité GroEL est visible sur le gel) solubilise une majorité de la nitrilase exprimée à partir de pXL2158.

Le même système d'expression a été utilisé pour produire la nitrilase chez *Pseudomonas putida*. Ainsi, à partir de pXL2158, les fragments NdeI/NcoI de 1256 pb et Nco I/BamHI de 535 pb ont été introduits entre les sites NdeI et BamHI de pXL1841. pXL1841 (Blanche et al., 1991. J. Bacteriol. 173:4637) est un dérivé de pKT230 (Bagdasarian et al., 1981. Gene. 15: 237) exprimant un gène de *Methanobacterium ivanovii* derrière P_{trp}-RBSCII.

Le plasmide pXL2169 final est donc un dérivé de pKT230 contenant un gène conférant la résistance à la kanamycine et le gène nit sous contrôle de P_{trp}-RBSCII (cf **fig. 10**). Ce plasmide a été introduit dans la souche de *Pseudomonas putida* G2081. G2081 est une dérivée de *Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian and Timmis, 1981. In Hofschneid and Goebel. Topics in Microbiology and Immunology. 47. Springer-Verlag. Berlin.) rendue résistante à l'acide nalidixique et à la rifampicine. Le vecteur pDSK519 (Keen et al., 1988, Gene. 70 191) a été utilisé comme plasmide témoin. G2081 (pXL2169) et la souche G2081 (pDSK519) ont été cultivées la nuit à 30°C en milieu LB contenant 20 mg/l de kanamycine. Ces précultures ont été diluées 100 fois dans le même milieu. Les cultures ont alors été poursuivies 7 h 30 min à la même température. L'expression de la nitrilase de *Comamonas testosteroni* NI 1 a été mesurée, après sonication des cellules, en gel SDS-PAGE 10 %, dans la fraction brute ou, après centrifugation, dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la **fig. 11**. Seul l'extrait brut de la souche G2081 (pDSK519) a été déposé (puits D). Pour la souche G2081 (pXL2169) l'extrait total, le culot de sonication et le surnageant de sonication ont été déposés, respectivement, dans les puits C, B et A. Il ressort de cette expérience que la souche de *Pseudomonas putida* exprime des quantités importantes de nitrilase sous forme soluble.

EXEMPLE 6 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ NITRILASE DE SOUCHES RECOMBINANTES.

Les exemples qui suivent illustrent l'activité nitrilase des souches recombinantes de *E. coli* TG1 et de *Pseudomonas putida* G2081.

Les différents plasmides intégrés dans ces souches sont les suivants.

Les activités de ces souches, induites ou non, sont mesurées sur adiponitrile et cyano-5-valérate, à différents pH et comparées aux souches témoins négatif : *E. coli* TG1, *E. coli* TG1 (pXL2035) et *Pseudomonas putida* G2081.

1 - PRÉPARATION DES CELLULES :

Les cultures sont réalisées dans les conditions décrites dans le tableau 4. Au cours de la phase exponentielle de croissance, une des deux cultures de la souche recombinante est induite par l'IPTG 1 mM ; après 2 h à 37°C, cette culture est traitée.

ABRÉVIATIONS :

a : milieu LB ; b : milieu LB + Amp 100 µg/ml ;

c : milieu b + ajout de IPTG 1 mM à une $DO_{660nm} = 1$; d : milieu LB + kanamycine 50 mg/l ; e :

milieu M9 + ampicilline 100 mg/l + kanamycine 50 mg/l ; PS : poids sec.

CONDITIONS COMMUNES :

1 à 3 : Ensemencement au 1/100ème à partir d'une préculture âgée de 16 h ; temps de culture 5, 75 h ; T°C 37.

4 à 8 : Ensemencement au 1/100ème à partir d'une préculture âgée de 17 h à 37° C avec addition de tryptophane ; temps de culture en fermenteur de 15 l : 23 h pour *E. Coli* et 7,5 h pour *P. putida* ; T°C 30.

2 - MESURES DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES :

Les conditions de mesures des activités spécifiques et les résultats sont répertoriés dans le tableau 5.

CONDITIONS COMMUNES :

[substrat] = 50 mM ; T°C = 25 ; tampon 50 mM ; cinétique sur 90 min pour 1 à 3 et sur 120 min pour 4 à 8.

ABRÉVIATIONS :

E : cellules entières ; S : cellules soniquées ; U : 1 µmol d'adipate produit/h sauf (a) 1 µmol de cyano-5-valérate produit/h ; Ua = µmoles de cyanovalérate produit/h/mg de cellules PS ; Ub = µmoles d'adipate produit/h/mg de cellules sèches ; AdN : adiponitrile ; CVA : cyano-5-valérate. PS : poids sec.

EXEMPLE 7 : SYNTHÈSE D'ADIPATE D'AMMONIUM PAR HYDROLYSE D'ADIPONITRILE EN BATCH PAR *E. coli* (pXL2087) EN SUSPENSION.

Dans un volume initial de 5 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7 contenant la souche *E. coli* (pXL2087) à une concentration initiale de 21 g/l, on a ajouté à 25°C et sous agitation magnétique 120 µl ou 1 068 µmoles d'adiponitrile à 0, 1,

2, 3, 5, 6 et 7 h de réaction. Le suivi analytique a été assuré par prélèvements de 100 µl du volume réactionnel toutes les heures. On a constaté que l'hydrolyse se fait sans perte notable de la cinétique.

Les activités moyennes calculées sur 30 min après ajout de l'adiponitrile sont rassemblées dans le tableau 6 ci-après.

EXEMPLE 8 : SYNTHÈSE D'ADIPATE D'AMMONIUM PAR HYDROLYSE DE L'ADIPONITRILE EN RÉACTEUR À LIT FIXE PAR *E. coli* (pXL2087) IMMOBILISÉE

SUR RÉSINE.

Les cellules d'*E. coli* (pXL2087) ont tout d'abord été fixées selon la technique décrite dans le brevet U.S. 4 732 851.

Le biocatalyseur résultant a ensuite été utilisé en colonne à lit fixe pour l'hydrolyse de l'adiponitrile en adipate d'ammonium.

- 1 - FIXATION DE *E. coli* (pXL2087) SUR RÉSINE.

Les cellules ont été fixées selon le protocole suivant :

- 1 g (poids humide) de *E. coli* (pXL2087) à 22 % de matières sèches,
- 1 g de polyazétidine POLYCUP,
- 1 g de résine DUOLITE A 171.

Le gramme de cellules a été mis en suspension dans la solution de polyazétidine. Après homogénéisation, la résine a été coulée dans la suspension cellulaire. L'ensemble a été agité à la spatule puis abandonné pendant 18 h, à l'air libre, sous une hotte, pour séchage. On a recueilli ainsi 4 ml ou 1,3 g de biocatalyseur.

Les activités des cellules immobilisées et libres ont été déterminées, à 25°C pH 7 sur une solution d'adiponitrile 50 mM. Elles sont respectivement de 30 et 110 µmoles de cyano-2-valérate/h/mg de cellules PS. On en déduit un rendement de fixation de 26 %.

- 2 - Hydrolyse de l'adiponitrile en réacteur à lit fixe :

La détermination du temps de demi-vie est réalisée en réacteur à lit fixe, continûment alimenté dans les conditions indiquées ci-après :

T°C 28 ; Catalyseur 0,5 g ou 2 ml ou 85 mg de cellules (poids sec) ; [adiponitrile] 50 mM ; tampon phosphate 50 mM pH 7 ; débit 3,7 +/- 0,1 ml/h ; colonne : diamètre 1 cm, hauteur 3 cm.

L'activité initiale des cellules était de 1,5 µmoles d'adipate/h/mg de cellules (poids sec). 66 % de l'activité initiale sont conservés après 32 jours ou 770 h.

Claims

- 1 - Séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase, (^) capable d'hydrolyser les nitriles en carboxylates, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

- la séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase (^) telle que représentée sur la fig. 4,
- un analogue de cette séquence résultant de la dégénérescence du code génétique,
- une séquence d'ADN hybridant avec l'une de ces séquences ou un fragment de celles-ci et codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase. (^)

- 2 - Séquence d'ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence nucléotidique suivante :

- 3 - Polypeptides résultant de l'expression d'une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 ou 2, et possédant une activité nitrilase. (^)
- 4 - Polypeptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :
- 5 - Micro-organisme contenant la séquence d'ADN selon les revendications 1 ou 2.
- 6 - Micro-organisme contenant la séquence d'ADN selon les revendications 1 ou 2 sur un plasmide comportant un moyen de sélection.
- 7 - Micro-organisme constitué par la souche *E. coli* TG1 contenant le plasmide pXL2148, souche référencée G4207 et déposée dans la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes sous le n° I-1242.
- 8 - Micro-organisme contenant une cassette d'expression constituée de la séquence d'ADN selon la revendication 1 ou 2 sous la dépendance de signaux assurant l'expression de cette séquence dans le micro-organisme hôte.
- 9 - Micro-organisme selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend en amont de la séquence d'ADN un site de fixation des ribosomes et une séquence promotrice homologue ou hétérologue du polypeptide produit.
- 10 - Micro-organisme selon la revendication 9, caractérisé en ce que le promoteur peut être le promoteur de l'opéron tryptophane P_{trp} de *E. coli*, le promoteur de l'opéron lactose Plac de *E. coli* ; le promoteur droit du phage lambda P_R, le promoteur gauche du phage lambda P_L, des promoteurs forts de *Corynebacterium*, de *Comamonas* ou de *Pseudomonas*.
- 11 - Micro-organisme selon la revendication 9, caractérisé en ce que le site de fixation des ribosomes peut être celui dérivé du gène CII du phage

lambda ou ceux dérivés de gènes de *E. coli*, *Comamonas*, *Pseudomonas* ou *Corynebacterium*.

- 12 - Micro-organisme selon les revendications 8 à 11, caractérisé en ce que la cassette d'expression est portée par un plasmide comportant un moyen de sélection.
- 13 - Micro-organisme selon la revendication 12, caractérisé en ce que le moyen de sélection est un marqueur conférant la résistance à un antibiotique.
- 14 - Micro-organisme selon les revendications 5 à 13, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les souches *E. coli*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*.
- 15 - Micro-organisme selon l'une quelconque des revendications 5 à 14, caractérisé :
 - en ce qu'il contient au moins un agent protéique d'aide au repliement des polypeptides qu'il synthétise et, en particulier, des polypeptides selon la revendication 3 ou la revendication 4 et/ou les gènes codant pour un tel agent,
 - et en ce que cet agent est présent dans une quantité supérieure à celle correspondant au niveau de base du micro-organisme considéré.
- 16 - Micro-organisme selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'agent est la chaperone GroE de *E. coli* ou son homologue d'origine eucaryote ou procaryote.
- 17 - Micro-organisme selon la revendication 15 ou la revendication 16, caractérisé en ce que les gènes codant pour l'agent sont portés par le chromosome ou par un élément extra-chromosique (plasmide, phage) et en ce qu'ils sont amplifiés.
- 18 - Micro-organismes selon la revendication 17, caractérisés en ce que les gènes codant pour l'agent sont sous la dépendance de systèmes d'expression homologues ou hétérologues audit micro-organisme.
- 19 - Procédé de transformation enzymatique de nitriles caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact les nitriles avec un polypeptide ayant une

activité nitrilase (^) selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4 ou un micro-organisme hôte selon l'une quelconque des revendications 5 à 19.

- 20 - Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le nitrile est un dinitrile de formule NC -

R - CN dans laquelle R est un groupe alkylène ayant de 1 à 10 atomes de carbone.

- 21 - Procédé selon l'une des revendications 19 et 20, caractérisé en ce que le nitrile est l'adiponitrile.

[Home](#)[Search](#)[List](#)[First](#)[Prev](#)[Next](#)[Last](#)☐ [Include](#)

For further information, please contact:
[Technical Support](#) | [Billing](#) | [Sales](#) | [General Information](#)